

VU Research Portal

Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling by the molecular chaperones Hsp90 and Cdc37

van Oosten-Hawle, P.C.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Oosten-Hawle, P. C. (2008). *Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling by the molecular chaperones Hsp90 and Cdc37*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

**Regulering van mitogen-geactiveerde
eiwit kinase signaaltransductie routes door de
moleculaire chaperonnes Hsp90 en Cdc37**

Moleculaire chaperonnes vormen een speciale groep eiwitten die een belangrijke rol spelen bij het proces van eiwitvouwing. Chaperonnes gaan interactie aan met instabiele eiwitten om zo aggregatie te voorkomen en het vouwingsproces naar de correcte eiwit-conformatie te faciliteren. Naast het vouwen van eiwitten, spelen moleculaire chaperonnes ook een belangrijke rol tijdens cellulaire processen zoals translocatie en afbraak van eiwitten en de activering van signaaltransductie-eiwitten.

Onderzoek naar de manier waarop de bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*) zich aanpast aan omstandigheden van hoge osmolariteit heeft details van een scala aan processen aan het licht gebracht zoals, detectie, signaaltransductie, genexpressie en metabole activiteiten. De signaaltransductie-processen die leiden tot adaptatie worden gestuurd door meerdere MAP-kinase routes, die elk opgebouwd zijn uit cascades van eiwitkinasen. Deze kinases hebben de unieke eigenschap dat ze erg instabiel zijn zolang ze hun biologische actieve vorm nog niet hebben verkregen. Twee bekende chaperonnes, Hsp90 en Cdc37, zijn gespecialiseerd in het stabiliseren van deze signalerings kinases door er fysiek aan te binden en zo verkeerde interacties te voorkomen. Tevens zorgen deze moleculaire chaperonnes ervoor dat de eiwitkinases geactiveerd worden. Door hun interactie met signaleringskinases spelen Hsp90 en Cdc37 een essentiële rol bij de regulering van een complex netwerk van signaaltransductie routes.

In dit proefschrift is onderzoek beschreven naar de rol van de moleculaire chaperonnes Hsp90 en Cdc37 in de signaaltransductie-routes die betrokken zijn bij de osmotische stress respons in bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*).

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een overzicht van de biologie van moleculaire chaperonnes en gaat in op de functionele en structurele aspecten van de moleculaire chaperonne Hsp90 en de co-chaperonne Cdc37. Tevens wordt het actuele model van kinase-maturatie met behulp van chaperonnes beschreven, zoals dat beschikbaar was bij de start van het onderzoek. In het tweede deel van hoofdstuk 1 wordt aandacht besteed aan de manier waarop de verschillende mitogen-geactiveerde proteïne kinase (MAPK) routes in de gist *S. cerevisiae* functioneren, en wordt uiteengezet op welke manier de High Osmolarity Glycerol (HOG) en de Protein Kinase C (PKC) MAPK routes de adaptatie aan hoge osmolariteit tot stand brengen.

In **Hoofdstuk 2** wordt beschreven welke eisen aan de biochemie van Hsp90 gesteld worden door de twee hoofdgroepen van Hsp90 substraat eiwitten, namelijk kinases en

glucocorticoid receptoren. Er werden zes gemuteerde Hsp90 eiwitten onderzocht elk met verschillende puntmutatie(s) in het middelste domein van Hsp90. Drie van deze mutaties (W300A, S485Y en T525I) hadden tot gevolg dat de gistcellen niet langer in staat waren bij 37° C te groeien. Verder onderzoek bracht aan het licht dat de snelheid van ATP hydrolyse en de sterkte van de binding van de co-chaperonnes p23 en Aha1, beiden noodzakelijk voor het goed functioneren van Hsp90, door deze drie mutaties waren verminderd. De co-chaperonnes p23 en Aha1 zijn betrokken bij de regulering van de ATPase cyclus van Hsp90, waarbij p23 de ATPase activiteit van Hsp90 remt en Aha1 de deze activiteit stimuleert. Alhoewel de eiwitten met de W300A, S485Y en T525I mutaties *in vitro* vergelijkbare biochemische eigenschappen hadden, was het effect van de verschillende mutaties *in vivo* wel zichtbaar. Zo was de activering van de glucocorticoid receptor (GR) door Hsp90 met de W300A mutatie niet verschillend van het wild-type eiwit en was de activiteit van het v-Src kinase in een Hsp90-W300A mutant zelfs verhoogd. Anderzijds was in de Hsp90-S485Y en Hsp90-T525I mutanten de activering van v-Src slechts weinig minder dan in het wild-type, maar was de activering van de GR wel sterk verminderd. De resultaten suggereren, dat verschillende substraateiwitten van Hsp90 (v-Src en GR) op verschillende plaatsen aan het Hsp90 midden-domein binden.

In het in **Hoofdstuk 3** beschreven onderzoek wordt het belang van Cdc37 voor de functionaliteit van twee van de MAPK signaleringsroutes, namelijk de HOG- en de PKC signaleringsroute, beschreven. De HOG signaleringsroute is betrokken bij adaptatie aan hoge osmolariteit en voorkomt dat de gistcel dood gaat. De PKC signaleringsroute is betrokken bij het detecteren van een beschadigde celwand, die het gevolg is van het blootstellen van de gistcel aan bepaalde chemische stoffen. Uit de literatuur was bekend dat de functionaliteit van Cdc37 afhankelijk is van de fosforylering van een uniek aminozuur in het N-terminale gedeelte van het eiwit, namelijk Serine 14. Wij hebben aangetoond dat ook voor de adaptatie aan hoge osmotische druk en celwand stress de fosforylering van Serine 14 essentieel is. Zo groeien gistcellen met het gemuteerde eiwit Cdc37-S14A zeer slecht bij hoge osmotische druk en in aanwezigheid van chemische stoffen die de celwand beschadigen, terwijl gistcellen met het eiwit Cdc37-S14E, een mutatie die de fosforylering nabootst, niet of minder gevoelig zijn. De conclusie lijkt gerechtvaardigd dat in de Cdc37-S14A mutant de HOG signaleringsroute tijdens osmotische druk en de activering van de PKC signaleringsroute tijdens celwand stress verstoord is. Het

onderzoek toont verder aan, dat het osmo-gevoelige phenotype van de Cdc37-S14A mutant zijn oorzaak vindt in het feit dat het Cdc37-S14A eiwit niet meer in staat is fysiek te binden aan Hog1, de MAP kinase van de HOG signaleringsroute. Op vergelijkbare wijze, wordt het celwand-stress-gevoelige phenotype van de Cdc37-S14A mutant veroorzaakt door verlies van de interactie van Cdc37-S14A met de MAP kinase van de PKC signaleringsroute (Slr2).

In **Hoofdstuk 4** staan experimenten beschreven die inzicht geven in de rol die Cdc37 speelt bij de "communicatie" tussen verschillende MAPK signaleringsroutes (= "crosstalk"). Niet alleen de gefosforyleerde vorm van Cdc37 blijkt een belangrijke rol te spelen; de-fosforylering van Cdc37-S14 blijkt van even groot belang voor de manier waarop Cdc37 de MAP kinase routes worden beïnvloed. Tijdens hoge osmotische druk kan ongewenste crosstalk tussen de HOG- en de Filamenteuze groei (FG) signaleringsroutes en ook tussen de HOG- en de PKC signaleringsroutes geïnduceerd worden door het gen voor het Hog1 eiwit uit het genoom te verwijderen. Onder deze omstandigheden wordt adaptie aan hoge osmotische druk niet door de HOG signaleringsroute maar door de FG- en PKC signaleringsroutes geïnitieerd. Een Cdc37-S14E mutant in combinatie met een *hog1* deletie veroorzaakt een zeer osmosensitief phenotype, terwijl een *cdc37-S14E* mutatie alleen geen negatief effect lijkt te hebben op het vermogen van de cel zich aan te passen aan de hoge osmotische druk. Ook wordt het phenotype van de Cdc37-S14A mutant door combinatie met een *hog1* deletie zeer versterkt. Om te bepalen welke effecten deze dubbelmutaties op de activiteit van de FG route en de PKC route hebben, is hun invloed op de activiteit van een reporter-gen bepaald en werd de fosforylering van de MAP kinases Kss1 (FG route) en Slr2 (PKC route) middels Western blot analyse in de mutanten geanalyseerd. Uit deze experimenten bleek dat transcriptie van FG- en PKC-afhankelijke genen in beide dubbelmutanten, (*cdc37-S14A, hog1* en *cdc37-S14E, hog1*) sterk verminderd was.

Naast ongewenste crosstalk tussen MAPK signaleringsroutes bestaat ook "gewenste" crosstalk. Deze laatste vorm van crosstalk, bijvoorbeeld tussen de HOG-, PKC en FG MAPK signaleringsroutes, is vereist tijdens het blootstellen van de gistcellen aan Zymolyase, een cocktail van celwand-afbrekende enzymen. De experimenten laten zien dat in de *cdc37-S14A, hog1* en ook in de *cdc37-S14E, hog1* mutant deze "gewenste" crosstalk tussen de drie MAPK signaleringsroutes verstoord is.

Hoofdstuk 5 beschrijft een “yeast two-hybrid” screen, uitgevoerd om potentiële nieuwe bindingseiwitten van de co-chaperonne Cdc37 (wild type en mutant Cdc37-S14A) te identificeren. Anders dan eerdere soortgelijke analyses, werden de constructen van deze screen voorzien van een Gal4-bindingsdomein aan de C-terminus, in plaats van de N-terminus, van Cdc37. Ons onderzoek heeft namelijk aangetoond, dat een Cdc37 eiwit met een tag aan het N-terminale eind niet functioneel is.

Het resultaat van de screen laat zien dat Cdc37 een veel grotere reeks van substraateiwitten heeft dan alleen kinases. Zo zijn veel van de interacterende eiwitten die met deze screen gevonden zijn, betrokken bij intracellulaire transportprocessen. Ook laat deze screen zien, dat het mutante Cdc37-S14A eiwit stabiele interacties met bepaalde substraateiwitten kan aangaan. Deze interacties werden met behulp van LacZ-assays bevestigd. Uit de resultaten van deze studie blijkt dus, dat ook de gefosforyleerde vorm van Cdc37 (S14A) een belangrijke fysiologische rol in de cel speelt. Deze observatie ondersteunt de in Hoofdstuk 4 getrokken conclusie dat niet alleen gefosforyleerd maar ook het ge-defosforyleerde Cdc37 eiwit cruciaal is voor crosstalk tussen verschillende signaleringsroutes.

In **Hoofdstuk 6** wordt een model beschreven, dat uitlegt hoe de functionaliteit van Cdc37, via fosforylering en defosforylering van Serine 14, door bepaalde cellulaire condities gereguleerd kan worden. Het is bekend dat bepaalde kinases die aan Hsp90 binden een belangrijke rol spelen bij de veranderingen die in gezonde (dierlijke) cellen plaatsvinden waardoor deze uitgroeien tot kankercellen. Op dit moment worden klinische proeven uitgevoerd om te testen of remmers van Hsp90 effectief zijn als kankertherapie. De resultaten van ons onderzoek geven aan dat ook remmers van Cdc37 potentiële, en mogelijk betere, kandidaten voor een dergelijke therapie zijn omdat remming van Cdc37 wel eens specifieker zou kunnen ingrijpen op de betreffende signaaltransductie routes dan de remming van Hsp90.